

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-224677

(43)Date of publication of application : 02.09.1997

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 C12P 21/02
 // C12N 1/21
 (C12P 21/02
 C12R 1:08)
 (C12N 1/21
 C12R 1:08)

(21)Application number : 08-053653

(71)Applicant : HIGETA SHOYU CO LTD

(22)Date of filing : 19.02.1996

(72)Inventor : TANAKA AKIMITSU
TAKAGI HIROAKI

(54) NEW HS GENE AND EXPRESSION PLASMID IN WHICH THE GENE IS CONNECTED TO
 DOWNSTREAM OF STRUCTURAL GENE CODING DIFFERENT KIND OF GENETIC PRODUCT AND
 PRODUCTION OF DIFFERENT KIND OF GENETIC PRODUCT WITH TRANSFORMANT HAVING THE
 EXPRESSION PLASMID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new HS gene having a
 specific base sequence and a homogeneous base sequence
 through an arbitrary base sequence and capable of transforming
 the bacteria of the genus Bacillus to massively secrete and
 produce various kinds of genetic products outside the cells.

SOLUTION: This new HS gene has a base sequence of formula I
 and a base sequence of formula II homologous to the base
 sequence of formula I through a sequence comprising an arbitrary
 3-20bp base sequence and disposed between both the sequences.
 The new HS gene can massively secrete and produce various kinds
 of genetic products outside cells by ligating the HS gene to the
 downstream of a structural gene coding the genetic products,
 transforming a Bacillus bacterium with the obtained expression
 plasmid and subsequently culturing the transformant. The HS gene
 is obtained by extracting the chromosomal DNA of the Bacillus
 bacterium, cleaving the DNA with a restriction enzyme, inserting
 the obtained fragment into a plasmid together with a foreign gene,
 expressing in host cells, selecting a cell capable of highly secreting
 and producing the products, and subsequently recovering the DNA
 placed on the downstream of the foreign gene.

GGACACTAAA TGGTGT J

ACAGGATTTG GTGTCC II

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-224677

(43) 公開日 平成9年(1997)9月2日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	H
// C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:08)				

審査請求 未請求 請求項の数 6 F D (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-53653

(22) 出願日 平成8年(1996)2月19日

(71) 出願人 000112060

ヒゲタ醤油株式会社

東京都中央区日本橋小網町2番3号

(72) 発明者 田中 昭光

千葉県銚子市飯沼町8-6

(72) 発明者 高木 広明

茨城県鹿島郡波崎町7707-8

(74) 代理人 弁理士 戸田 親男

(54) 【発明の名称】 新規H S遺伝子及び該遺伝子を異種遺伝子
遺伝子の下流に連結

産物をコードする構造
した発現プラスミド並びに該発現プラスミ

(57) 【要約】

【解決手段】 配列番号1の塩基配列 (G G A C A C T A A A T G G T G T) とこの配列に対して相補性を有する配列番号2の塩基配列とを有し、且つ両配列の間に任意の3~20bpの塩基配列からなる配列を介してなる新規H S遺伝子、及び、異種遺伝子産物をコードする構造遺伝子の下流でH S遺伝子を連結してなる新規発現プラスミド。

【効果】 この発現プラスミドでバチルス属菌を形質転換し、この形質転換体を培養することにより、各種遺伝子産物を大量にしかも菌体外に分泌、生産せしめることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 任意の塩基配列を介してお互いが相補性を有する配列番号 1 と配列番号 2 の塩基配列を有することを特徴とする H S 遺伝子。

【請求項 2】 任意の塩基配列が、アデニン、グアニン、シトシン、チミンから選ばれる任意の 3 ～ 20 b p の塩基配列であることを特徴とする請求項 1 に記載の H S 遺伝子。

【請求項 3】 配列番号 3 の塩基配列で示される請求項 1 又は請求項 2 に記載の H S 遺伝子。

【請求項 4】 異種遺伝子産物をコードする構造遺伝子の下流に請求項 1 ～請求項 3 のいずれか 1 項に記載の H S 遺伝子を連結してなること、を特徴とする発現プラスミド。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の発現プラスミドを保有するバチルス属細菌を培養することにより、異種遺伝子産物を培養物中に生成、蓄積せしめ、これを採取すること、を特徴とする異種遺伝子産物の製造法。

【請求項 6】 異種遺伝子産物がヒト上皮細胞増殖因子であることを特徴とする請求項 5 に記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、バイオテクノロジーに関するものである。更に詳細には、本発明は、新規遺伝子及び該遺伝子を異種遺伝子産物をコードする構造遺伝子の下流に連結した発現プラスミド並びに該プラスミドで形質転換したバチルス属細菌を培養することにより、異種遺伝子産物を培養物中に生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする異種遺伝子産物の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、組換え体を用いた異種遺伝子産物の生産は、食品、薬品、化粧品その他の産業において広く利用されている。そして遺伝子組換えの宿主菌としては大腸菌や枯草菌などの細菌や酵母、糸状菌などが使用されている。

【0003】遺伝子組換え技術は大腸菌 (*Escherichia coli*) の系を中心に発展してきたため、大腸菌が宿主菌としてよく利用されている。しかし大腸菌を宿主とする系では、生産されるペプチドや蛋白質などの異種遺伝子産物は細胞質中または細胞の外膜と細胞質膜に囲まれたペリプラズム空間にとどまり、培地中へ分泌生産させることは困難であった。細胞内への異種遺伝子産物の蓄積には量的に限界があり、さらに菌体を破砕して異種遺伝子産物を回収しなければならず、菌体内成分である核酸などの共存物質から目的とする異種遺伝子産物を分離、精製することが必要であった。また生産されたペプチドや蛋白質が封入体 (inclusion body) を形成するものもあり、封入体が形成された場合再生操作を行って活性型にする必要があるなどの欠点があった。

【0004】バチルス属細菌には酵素蛋白質を大量に分泌生産するものが多く、この性質を利用した宿主ベクター系の開発が活発に行われている。バチルス属細菌、なかでも枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は、遺伝学的にも生化学的にもよく研究され、異種遺伝子産物の分泌生産に関する研究も数多くなされている。しかし、枯草菌を宿主とする系では菌体内外の強いプロテアーゼにより生産したペプチドや蛋白質などの異種遺伝子産物が分解されてしまうなどの問題があった。

- 10 【0005】これらの欠点を解消するため、鋭意研究を行ったところ、鶴高らはバチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*) にはプロテアーゼを生産しない菌株が多いことを見いだした。その 1 菌株バチルス・ブレビス 47 (S. Uda and H. Yamagata, Methods in Enzymology, 217 23-33(1993)) の主要菌体外タンパク質 (H. Yamagata et al, J. Bacteriol., 169, 1239(1987); 塚越規弘、日本農芸化学会誌、61, 68(1987)にそれぞれ“outer wall protein and middle wall protein”、“主要菌体外タンパク質”として記載されている。) 遺伝子のプロモーターおよび該主要菌体外タンパク質の 1 種である MW タンパク質 (middle wall protein) のシグナルペプチドをコードする領域を用いて分泌ベクターを作製し、本菌株を宿主として α -アミラーゼ (特開昭 62-201583 号公報、H. Yamagata et al, J. Bacteriol., 169, 1239(1987)) やブタペプシノーゲン (鶴高重三、日本農芸化学会昭和 62 年度大会講演要旨集、p 837-838; 塚越規弘、日本農芸化学会誌、61, 68(1987)) の分泌生産に成功した。

- 30 【0006】また、高木らはバチルス・ブレビスのプロテアーゼを菌体外に生産しない菌株バチルス・ブレビス HPD31 (なお、この菌株はバチルス・ブレビス H102 (FERM BP-1087) と同一菌株である) を分離した。そしてこのバチルス・ブレビス HPD31 を宿主として耐熱性 α -アミラーゼの高分泌生産 (H. Takagi et al, Agric. Biol. Chem., 53, 2279-2280(1989)) や山形形によるヒト EGF の高分泌生産 (H. Yamagata et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3589-3593(1989)) に成功している。

【0007】

- 40 【発明が解決しようとする課題】上記のように、たしかにバチルス属細菌、特にバチルス・ブレビスを宿主菌とする異種遺伝子産物の生産性は、他の宿主菌に比べ飛躍的に向上してはいるが、バチルス・ブレビスをはじめ、バチルス属細菌を宿主とする系での異種遺伝子産物生産のためには、バチルス属細菌で複製可能な発現ベクターを用い、適合するプロモーター、その下流には SD 配列、翻訳開始コドンから始まる分泌シグナル配列、その後に異種遺伝子を接続しなければならない。しかし、このような従来技術では異種遺伝子産物の生産量が非常に少ない場合も認められ、産業上適用するためにはもう一

段の技術開発が必要とされている。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、このような技術の現状に鑑み、バチルス属細菌が蛋白質を菌体外に分泌生産するというすぐれた技術に着目し、そして更にその生産性を高めて実験室規模から工業生産規模へとレベルアップする目的で、バチルス・プレビスの分泌生産性を向上させることができる遺伝子の存在について鋭意検討を行った。そして先ず、本発明者らは、バチルス・プレビスによるヒト唾液腺アミラーゼの分泌生産を検討中、ヒト唾液腺アミラーゼをコードする構造遺伝子を保有するプラスミド p T S 7 (H. Konishi, Appl. Microbiol. Biotechnol., 34, 297-302(1990)) を1ヶ所で切断する制限酵素で切断後、同酵素で切断したバチルス・プレビス染色体断片と連結したプラスミドで形質転換した50000株のバチルス・プレビスの中から、ヒト唾液腺アミラーゼの生産量が著しく多い株を見出した。

【0009】この形質転換体からプラスミドを抽出し、遺伝子解析を行ったところ、ヒト唾液腺アミラーゼをコードする構造遺伝子の下流に約150bpの遺伝子が挿入されていることが分かった。そこでさらに本遺伝子を*

【配列表】

配列番号：1
配列の長さ：16
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Genomic DNA
配列
GGACACTAAA TGGTGT

16

【0013】

配列番号：2
配列の長さ：16
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Genomic DNA
配列
ACACCATTTG GTGTCC

16

【0014】すなわち本発明は、新規H S 遺伝子及び該H S 遺伝子を異種遺伝子産物をコードする構造遺伝子の下流に連結した発現プラスミド並びに該プラスミドで形質転換したバチルス属細菌を培養することにより、異種遺伝子産物を培養物中に生成、蓄積せしめ、これを採用することを特徴とする異種遺伝子産物の製造法に関する。以下、本発明について詳しく説明する。

【0015】

10

* 取り出して塩基配列を決定し、構造解析を行ったところ、本遺伝子には15bpの塩基対から成る配列を介してお互いが相補性を有する配列が存在し、mRNAに転写された際ステム・ループ構造をとると思われた。

【0010】そこで本遺伝子をヒト唾液腺アミラーゼ以外の異種遺伝子産物をコードする構造遺伝子の下流に連結し、宿主菌に組み込んで該異種遺伝子産物を生産させたところ、異種遺伝子産物の生産量が増加することが分かった。さらに、詳しく検討したところ、異種遺伝子産物の生産量を増加させるには、3~20bpの任意の塩基対からなる配列を介して、お互いが相補性を有する配列番号1と配列番号2の配列があればよい、という有用な知見を新たに得た。本発明は、これらの有用新知見に基づき更に研究の結果、遂に完成されたものである。

【0011】なお、以後、この3~20bpの任意の塩基対からなる配列を介して、お互いが相補性を示す配列表の配列番号1（下記表1）と配列番号2（下記表2）の配列を有する遺伝子をH S 遺伝子と称する。

【0012】

【表1】

※ ※ 【表2】

【発明の実施の形態】本発明のH S 遺伝子は、3~20bpの任意の塩基対から成る配列を介してお互いが相補性を有する配列番号1と配列番号2の配列を有する遺伝子であり、この相補性を有する配列を介する3~20bpの配列は、アデニン、グアニン、シトシン、チミンから選ばれる任意の塩基配列であればよい。具体的には15bpの塩基対を介して配列番号1と配列番号2の配列が連結された配列番号3（下記表3）の遺伝子などが挙

50

5

6

げられる。また異種遺伝子産物の生産にはH S 遺伝子のほかにH S 遺伝子の5' 末端や3' 末端に塩基対が付加された遺伝子も用いることもできる。具体的には配列番号3で示されるH S 遺伝子の5' 末端に86bp、3' *

* 末端に24bpの塩基対が付加された配列番号4（下記表4）で示される遺伝子などを用いることが出来る。

【0016】

【表3】

配列番号：3

配列の長さ：47

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

GGACACTAAA TGGTGTGCGTA TTCICAAAGT AACACCAITTT GGTGTCC

47

【0017】

※ ※ 【表4】

配列番号：4

配列の長さ：157

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

AAGCTTCGGC ATTATAGTGC GGAGGCTTTT ICGC ATG CAG GTA GGG AAC AAT TAC 55

Met Gln Val Gly Asn Asn Tyr

5

ATT GTC TTT GAT TGT AAA AAT GCT GTT GAC AGG ACA CTA AAT GGT GTC 103

Ile Val Phe Asp Cys Lys Asn Ala Val Asp Arg Thr Leu Asn Gly Val

10

15

20

GTA TTC TCA AAG TAACACCATT TGGTGTCCAA TTGCAAGTCA TTGGTAAGC TT 157

Val Phe Ser Lys

25

【0018】H S 遺伝子は、目的異種遺伝子産物をコードする構造遺伝子の下流に連結する。この場合、構造遺伝子に直結してもよいが、上記の配列番号4で示される遺伝子のように数〜数十bpの塩基対を介して連結してもよい。

【0019】本発明で分泌生産する異種遺伝子産物は真核、原核何れの生物由来の遺伝子でもよく、ヒト、動物、鳥類、魚類、微生物その他各種生物由来の遺伝子産物（酵素、ホルモン、インターフェロン、免疫グロブリン、その他生理活性ペプチド、蛋白質など）の生産に適用できる。例えばヒト上皮細胞増殖因子（hEGF）などの遺伝子産物の生産に適用できる。

【0020】本発明で分泌生産する異種遺伝子産物をコードする構造遺伝子とその下流に連結した本発明のH S 遺伝子を宿主菌内に導入、保持させるベクターは、宿主内で複製可能なプラスミドを利用することができる。例えば枯草菌（バチルス・ズブチリス）の系ではpUB110やそれらの派生体が使用でき、バチルス・プレビスを宿主とする系では、pNU200（鶴高重三、日本農

芸化学会誌、61、669(1987))、pHY700(S. Ebisu et al, Biosci. Biotech. Biochem., 56, 812-813(1992))、pHT110（特開平6-133782）やこれらの派生体などのプラスミドを使用できる。

【0021】これらのプラスミドを構築する方法としては、公知の方法が適宜用いられ、例えばモレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリーマニュアル第2版、ワールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー（Molecular Cloning 2nd ed., A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989）に記載の方法などが例示される。

【0022】本発明において宿主菌として用いる細菌は、バチルス属に属する細菌であればよいが、枯草菌やバチルス・プレビス、バチルス・チョーシネンシス（*Bacillus choshinensis*）などが好適に使用できる宿主菌を形質転換する方法は公知の方法で良く、例えば、Takashiらの方法（Takahashi et al, J. Bacteriol., 156, 1130(1983)）またはTakagiらの方法（H. Takagi et al, Agric. Biol. Chem., 53, 3099-3100(1989)）などが例

示される。

【0023】得られた形質転換体の培養に用いる培地は、形質転換体が生育して目的とする異種遺伝子産物を生産しうるものであれば如何なるものでもよい。該培地に含有される炭素源としては、例えばグルコース、シュクロース、グリセロール、澱粉、デキストリン、糖蜜、尿素、有機酸などが用いられる。また窒素源としては、カゼイン、ポリペプトン、肉エキス、酵母エキス、カザミノ酸、グリシンなどの有機窒素源、硫酸アンモニウムなどの無機窒素源などが用いられる。その他、塩化カリウム、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウムなどの無機塩が必要に応じて培地に加えられる。栄養要求性を示す菌はその生育に必要な栄養物質を培地に添加すればよい。該栄養物質としては、アミノ酸類、ビタミン類、核酸などが挙げられる。

【0024】また、培養に際して必要があれば、培地に抗生物質例えばペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、バシトラシン、D-サイクロセリン、アンピシリン、ネオマイシンなどを加える。更に必要により、消泡剤例えば大豆油、ラード油、各種界面活性剤などを加えてもよい。培地の初発pHは5.0~9.0、さらに好ましくは6.5~7.5である。培養温度は通常15℃~42℃、さらに好ましくは24℃~37℃であり、培養時間は通常16~166時間、さらに好ましくは24~96時間である。

【0025】本発明で、形質転換体を前記の条件で培養することによって、培養物中に異種遺伝子産物が生成、蓄積される。このようにして得られた異種遺伝子産物は公知の方法により、例えば膜処理、硫酸分画法、クロマトグラフィーなど（蛋白質・核酸の基礎実験法、南江堂、(1985)）で精製することができる。本発明では、HS遺伝子を目的とする異種遺伝子産物をコードする構造遺伝子の下流に連結することによって様々な異種遺伝子産物を高レベルで安定して生産することが可能となった。

【0026】以下本発明を実施例により更に詳しく説明するが、これは例示的なものであり、本発明はこれに限定されるものではない。

【0027】

【実施例1】

表A ヒト唾液腺アミラーゼ生産量

菌 株	ヒト唾液腺アミラーゼ生産量mg/l
pTS7株	20
HS株	160

【0032】HS株よりアルカリ抽出法（Birnoboin, H. C. and Doly J., Nucleic Acids Res., 7, 1513(1979)）でプラスミドpTS7HSを抽出し、HindIII

* ① HS遺伝子を含む遺伝子（HS' 遺伝子）のクローニング及びその解析バチルス・プレビス HPD31

（FERM BP-1087）の染色体DNAをSaito, Miuraの方法（Saito, H. and Miura, K., Biochem. Biophys. Acta., 72, 639(1964)）により抽出した後、制限酵素HindIIIで消化し断片化した。次にヒト唾液腺アミラーゼをコードする構造遺伝子を有するプラスミドpTS7（H. Konishi, Appl. Microbiol. Biotechnol., 34, 297-302(1990)）をHindIIIで処理し、更にアルカリフォスファターゼで5'末端を脱リン酸化した後、0.8%ハイアガロースゲル電気泳動に供し、6.1kbのDNA断片をGene clean（Bio 101, USA）を用いて回収、先に断片化した染色体DNAとT4リガーゼを用いて連結し、プラスミドpTS7HSを得た。

【0028】得られたプラスミドpTS7HSでバチルス・プレビス HPD31をエレクトロポレーション法（H. Takagi et al, Agric. Biol. Chem., 53, 3099-3100(1989)）によって形質転換した。形質転換体からのヒト唾液腺アミラーゼの高分泌生産株の選択は1.0%澱粉を含むT2プレート培地（澱粉1%、ペプトン1%、肉エキス0.5%、酵母エキス0.2%、グルコース1%、寒天1.5%、pH7.0）に培養後0.2%I₂-KI溶液を噴霧し、コロニーの周りが透明になるかどうか（澱粉が分解された際生じるハロ）を確認して行った。

【0029】その結果約50000個のハロを生じるコロニーを得、その中からプラスミドpTS7を保有するバチルス・プレビスHPD31株（pTS7株）の2倍以上の大きさのハロを形成する株を見出し、その株をHS株とした。

【0030】ここで得られたHS株とpTS7株をT2Em液体培地にそれぞれ接種し、30℃で2日間振とう培養した後、培養上清中に含まれるヒト唾液腺アミラーゼ量を可溶性澱粉を基質としたSaitoの方法（Saito et al, Agric. Biol. Chem., 155, 290(1973)）でアミラーゼ活性を測定し求めた。その結果、下記の表13に示される表Aに示す様にHS株はpTS7株の約8倍量のヒト唾液腺アミラーゼを生産していた。

【0031】

【表13】

で切断後5%アクリルアミドゲル電気泳動に供した。その結果、pTS7HSにはプラスミドpTS7のHindIIIサイトに約150bpの遺伝子が挿入されている

ことが確認された。

【0033】ここで得られた遺伝子の塩基配列を解析したところ、配列番号4で示す157塩基対から成る遺伝子であることが分かった。またこの配列を基に構造解析を行った結果、5'末端から数えて87番目から102番目及び118番目から133番目までの2つの領域は、RNAに転写された際ステム構造をとると思われる相補性を有する配列（パリンδροーム構造）が存在していた。また、この配列には配列番号4に示すアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするオープンリーディングフレームが存在した。この157塩基対から成る遺伝子をHS'遺伝子とした。

【0034】②HS'遺伝子を用いたhEGFの分泌生産

配列番号：5
配列の長さ：28
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列
TTTGGATCCC GGCATTATAG TCGGAGG

*

28

【0036】

※ ※【表6】

配列番号：6
配列の長さ：28
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列
TTTAAGCTTA CCAAATGACT TGCAATTG

28

【0037】次いで、バチルス・プレビス HP926 (FERM BP-5382) が保有するプラスミドpHT926より調製したプラスミドpHT110EGF (特開平6-133782) をBamHIとHindIIIで処理し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、3.5kbの断片をGene clean (Bio 101, USA) を用いて回収後、先に得たHS' B遺伝子断片とT4リガーゼを用いて連結しプラスミドpHT110EGF-HS' Bを得た。バチルス・プレビス HPD31への導入は、①と同様の方法で行い、pHT110EGF-HS' Bを保有するバチルス・プレビス HPD31/pHT110EGF-HS' B株を得た。

【0038】ここで得たバチルス・プレビス HPD31/pHT110EGF-HS' Bを2SLE液体培地（ペプトン4%、酵母エキス0.5%、グルコース2%、MgSO₄ 0.01%、FeSO₄ 0.001

* プラスミドpTS7HS' 遺伝子を下記の表5に示される配列番号5のPrimer HSM1と下記の表6に示される配列番号6のPrimer HSRVを用いてPCR法にて増幅した（Primer HSM1によりHS' 遺伝子の5'側のHindIIIサイトはBamHIサイトに変換される。本遺伝子をHS' Bとした。）。増幅したHS' B遺伝子をBamHI、HindIIIで処理し、5%アクリルアミドゲル電気泳動に供し、HS' B遺伝子断片を電気溶出法（Molecular Cloning 2nd ed., A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989）にて回収した。

【0035】

【表5】

%、MnSO₄ 0.001%、ZnSO₄ 0.0001%、エリスロマイシン10μg/ml、pH7.2) を3ml分注した試験管に植菌し、30℃で3日間振とう培養後、その培養上清中のhEGF量をHPLC（カラム：C18-100A、径4mm×長さ250mm、バッファー：0.1%TFA/H₂O、0.1%TFA/50%アセトニトリル、リニアグラジエント、検出：UV276nm）で分析し、市販EGF（フナコシ（株）社製）を標準品として同条件でHPLCを行った時のピーク面積と比較して生産量を求めた。その結果、下記の表14に示される表Bに示すようにバチルス・プレビス HPD31/pHT110EGF-HS' Bはバチルス・プレビス HPD31/pHT110EGFの約1.4倍量のhEGFを生産していた。

【0039】

【表14】

表B hEGF生産量

菌 株	hEGF生産量g/l
B. brevis HPD31/pHT110EGF	0.8
B. brevis HPD31/pHT110EGF-HS' B	1.1
B. brevis HPD31/pHT110EGF-HSS	1.2
B. brevis HPD31/pHT110EGF-HSFS	1.1
B. brevis HPD31/pHT110EGF-HS3	1.2
B. brevis HPD31/pHT110EGF-HS20	1.0
B. brevis HPD31/pHT110EGF-HS	1.1

【0040】

【実施例2：HS'遺伝子の構造が異種遺伝子産物生産に与える影響】配列番号6のPrimer HSRVと下記表7に示される配列番号7のPrimer HSSを用いて、PCRにて変異HS'遺伝子HSSを作製した。同様に配列番号6のPrimer HSRVと下記の表8に示される配列番号8のPrimer HSFSを用いて変異HS'遺伝子HSFS、配列番号6のPr*

*imer HSRVと下記の表9に示される配列番号9のPrimer HS3を用いて変異HS'遺伝子HS3、配列番号6のPrimer HSRVと下記の表10に示される配列番号10のPrimer HS20を用いて変異HS'遺伝子HS20を作製した。

【0041】

【表7】

配列番号：7

配列の長さ：60

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTTGGATCCC GGCATTATAG TCGGGAGGCT TTTTCGCATG CAGGCTTAGG GAACAATTAC 60

【0042】

※ ※ 【表8】

配列番号：8

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTTGGATCCG ACAGGACACT AAAATG 26

【0043】

★ ★ 【表9】

配列番号：9

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTTGGATCCG ACAGGACACT AAATGGTGTG TAACACCATT TGGTGTCC 48

【0044】

【表10】

13
 配列番号：10
 配列の長さ：65
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列
 TTGGATCCG ACAGGACACT AAATGGGTA TGCCCGTATT CTCAAAGTAA CACCATTGG 60
 TGTC 65

【0045】HSSは、5'末端から配列番号1のHS'までが10bpであり、配列番号4のHS'遺伝子よりも76bp短くなっている。HSFSはフレームシフトによってHS'遺伝子がコードする27のアミノ酸からなる蛋白質は翻訳されない。HS3、HS20は、RNAに転写された際、ステム・ループのループがそれぞれ3bp、20bp（配列番号4のHS'遺伝子は15bp）となっている。

【0046】作製した4種の変異HS'遺伝子をそれぞれHindIIIとBamHIで切断後、5%アクリルアミドゲル電気泳動に供し、電気溶出法にて変異HS'遺伝子をそれぞれ回収した。得られた断片を実施例1と同様の方法にてプラスミドpHT110EGFに挿入し、pHT110EGF-HSS、pHT110EGF-HSFS、pHT110EGF-HS3、pHT110EGF-HS20を構築した。

【0047】各々のプラスミドでバチルス・プレビスHPD31を形質転換し、実施例1と同様の方法で培養し、培養上清中のhEGF量を測定した。その結果を表Bに示すが、ここで作製した4種の変異HS'遺伝子は、配列番号4のHS'遺伝子を使用したときと同程度のhEGFを生産していた。このことから、異種遺伝子産物の分泌生産性の向上は、27アミノ酸残基よりなるペプチドが影響を与えるのではなく、HS'遺伝子上のパリンドローム構造が重要であると考えられ、また、HS'遺伝子がmRNAに転写された際のステム・ループのループとなる部分は3~20bpであればよいことが*

配列番号：11
 配列の長さ：28
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列
 TTTCTGCAGG AACTAAATG GTGTCGTA

* 分かった。

【0048】

【実施例3：HS'遺伝子（HS'遺伝子のパリンドローム構造領域）の異種遺伝子産物生産に与える影響】実施例2の検討結果から、異種遺伝子産物の分泌生産向上には、HS'遺伝子のパリンドローム構造が重要であると考えられた。そこでHS'遺伝子のパリンドローム構造領域のみ（配列番号3）をpHT110EGFのhEGF遺伝子の下流に挿入し、hEGF生産性を確認した。

【0049】下記の表11に示される配列番号11のPrimer STEMと下記の表12に示される配列番号12のPrimer STEMRVを用い、HS'遺伝子上のパリンドローム構造領域（HS'遺伝子）を増幅した。得られたHS'遺伝子をPstIで処理後T4DNAポリメラーゼを反応させてHS'遺伝子断片を平滑化し、10%アクリルアミドゲルに供し、約60bpの断片を回収した。次いでpHT110EGFをBamHI、HindIIIで処理後、T4DNAポリメラーゼにて平滑化し、アルカリフォスファターゼで処理後、アガロースゲル電気泳動に供し、3.5kbの断片をGene cleanを用いて回収、先に得たHS'遺伝子とT4リガーゼを用いて連結し、プラスミドpHT110EGF-HSを構築した。バチルス・プレビスへの導入は実施例1と同様の方法にて行い、また挿入されたHS'遺伝子の方向性はDNAシーケンスを行い確認した。

【0050】

【表11】

【0051】

【表12】

配列番号：12

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTTCTGCAGG ACACCAAATG GTGTTAC

【0052】得られた形質転換体を実施例1と同様の方法で培養し、hEGF生産量を測定した結果、表Bに示すようにpHT110EGF-HSはpHT110EGF-HS'と同程度、またpHT110EGFに比べ、1.3倍量のhEGFを生産していた。

【0053】

【発明の効果】本発明により、新規HS遺伝子が新たに*

10* 開発された。この新規HS遺伝子は、異種遺伝子産物をコードする構造遺伝子の下流に連結することができ、このようにして調製した新規発現プラスミドは、これを用いてバチルス属細菌を形質転換し、得られた形質転換体を培養することによって、各種の異種遺伝子産物を大量にしかも菌体外に分泌生産せしめることができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶
(C12N 1/21
C12R 1:08)

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

(54)【発明の名称】 新規HS遺伝子及び該遺伝子を異種遺伝子
遺伝子の下流に連結

産物をコードする構造

した発現プラスミド並びに該発現プラスミ

ドを保有する形質転換体を用いた異種遺伝

子産物の製造法